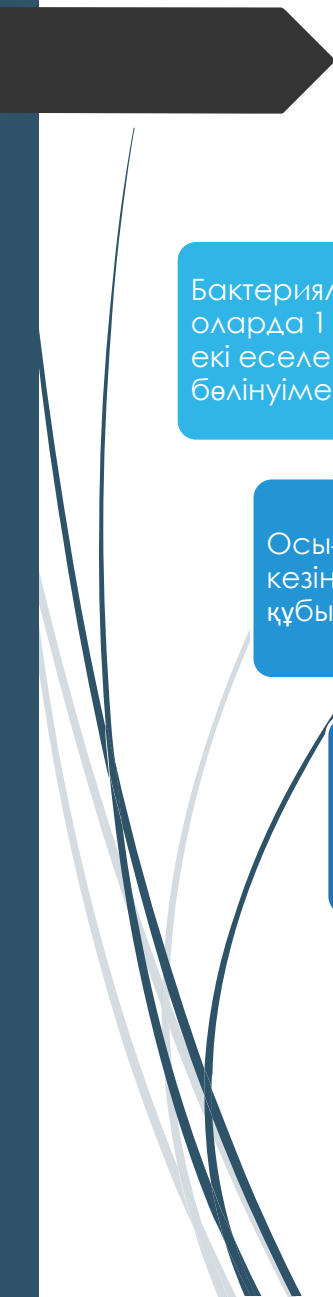


Прокариоттардың геномдары.
Бактериялардың генетикалық
материалы. Геномдардың
құрылымдық, функциональдық
элементтері

3 дәріс

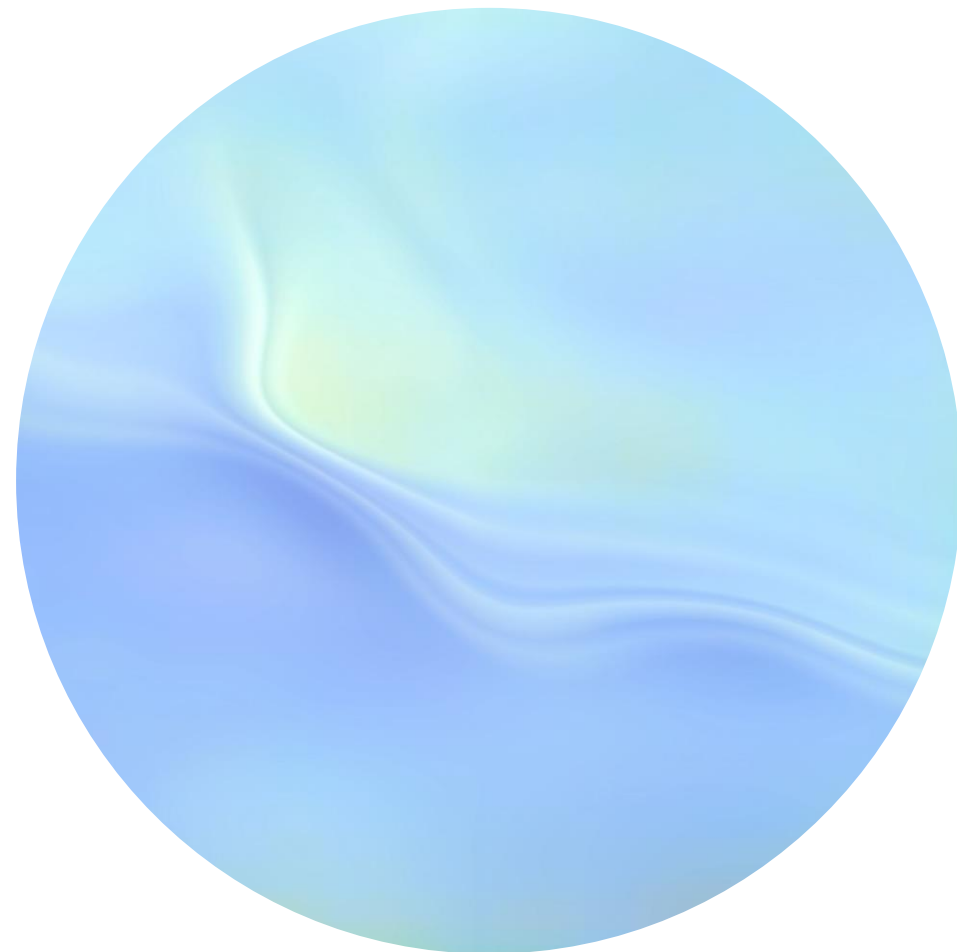


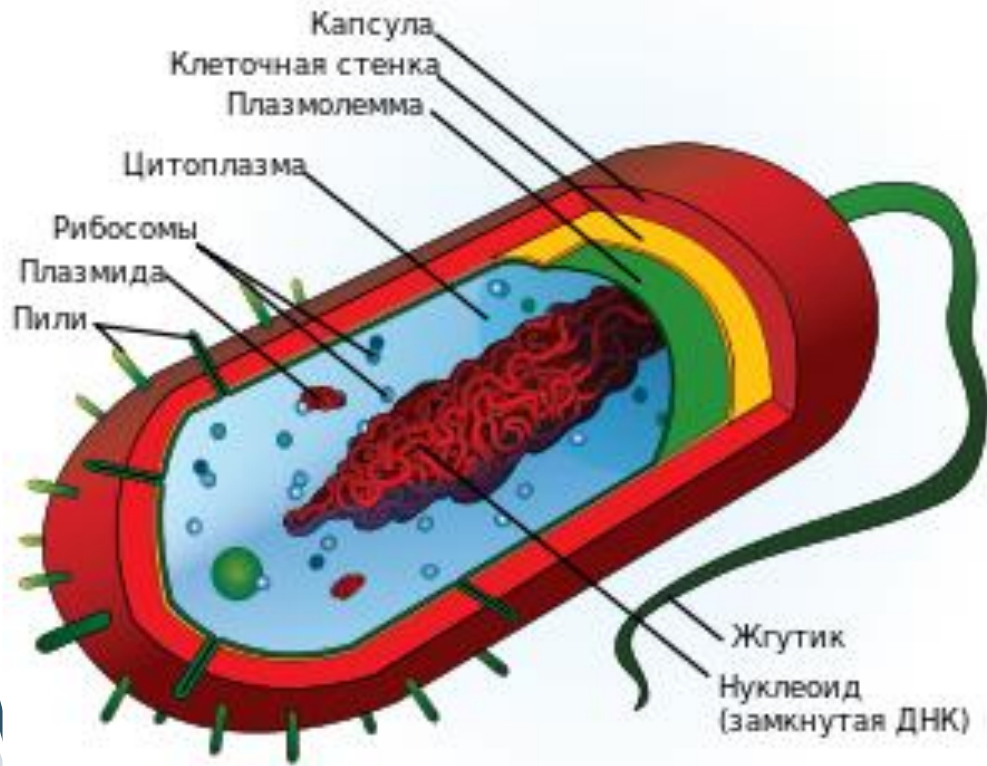
Бактериялар гаплоидты организмдер, яғни оларда 1 хромосома бар (хромосоманың екі еселенуі әрқашан жасушаның бөлінуімен бірге жүреді);

Осыған байланысты белгілерді тұқым қуалау кезінде доминанттылық, рецессивтілік құбылыстары болмайды;

«Жыныс» дифференциациясы, сәйкесінше генетикалық ақпаратты беретін немесе алатын донор және реципиент бактериялық жасушалардың болуынан тұрады.


Бактерияларда жеке ДНҚ фрагменттерінің болуы – плазмидалар, транспозондар, профагтар, Is-элементтер, патогенділік аралдары.





Бактериялардың генетикалық жүйесі «хромосомалық» және «хромосомадан тыс» құрылымдардан тұрады.

Прокариоттық ядроның аналогы – бактериялық «хромосома» эукариот жасушаларының ядросынан айтарлықтай ерекшеленеді. Ол қабығы жоқ және бактерияның барлық дерлік ДНҚ-сын қамтитын нуклеоидтен тұрады.



Бактериялардың барлық гендерінің жиынтығы геном деп аталады.

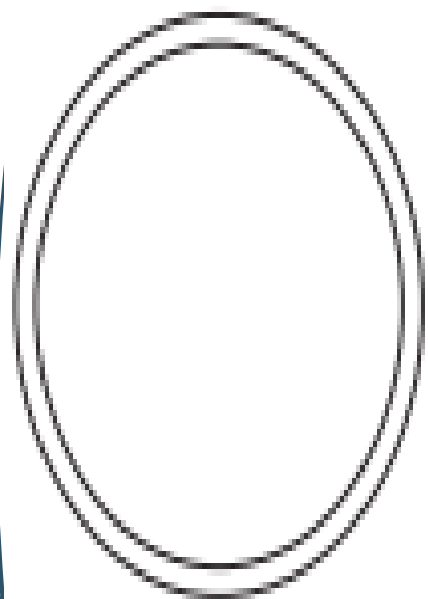
Геномның өлшемі негіздердің нуклеотидтік жұптарының санымен анықталады (н.ж.). Бактериялық геном тәуелсіз репликацияға (көбеюге) қабілетті генетикалық элементтерден тұрады, яғни. репликондар және өзін-өзі репликациялауға қабілетсіз болады.

Бактерия геномының функционалдық бірліктері:

- «Хромосомалық» гендер (нуклеоидты) репликондар
- Плазмидті гендер
- IS тізбектері
- транспозондар, ретротранспозондар
- Профагтар
- Геномдық аралдар және т.б.

Состав генома прокариот

Локализация	Структуры
Хромосома Плазмиды	Кодирующие последовательности генов Нетранслируемые области генов: 5'- и 3'-концевые районы, интроны Регуляторные элементы генома: промоторы, терминаторы транскрипции, сайты связывания регуляторных белков, сайты связывания рибосом Сайты связывания с клеточными мембранами Мобильные элементы Интегроны Профаги и интегрированные в хромосому плазмиды CRISPR – структуры



Кольцевая хромосома



Линейная хромосома
с незамкнутыми концами



Линейная хромосома
со «шпигельными» концами


өдетте, бір нүктеде бірім бекітілген, спиральданған және сақина тәрізді бір қос тізбекті ДНҚ молекуласынан тұрады және бактерия жасушасының өмірлік маңызды функцияларын кодтайды.


- Прокариоттар патшалығының әртүрлі өкілдерінде бактериялық хромосоманың өлшемдері 3×10^8 -ден $2,5 \times 10^9$ Д дейін өзгереді. Мысалы, *E. coli*-де бактериялық «хромосома» $4,7 \times 10^6$ н.т құрайды. Оның құрамында шамамен 4300 ген бар.
- Салыстыру үшін: вирустардың ДНҚ мөлшері шамамен 10^3 н.т., ашытқылар – 10^7 н.т, ал адамның хромосомалық ДНҚ-ның жалпы

Эукариоттардан бактериялардың айырмашылығы басқа механизмдерді пайдаланады: мысалы, стрептомицеттерде репликацияның инициациясы үшін бос 3'-ОН соңы 5'-ұштарымен белоктар ковалентті байланысатын сызықты хромосомалар бар. Басқа ковалентті сызықты хромосомалардың түрі жабық «қыстырғыш» ұштары, *Borrelia* тұқымдасының спирохеталарында табылған

Размеры и структуры геномов некоторых прокариот

Вид бактерии или археи	Состав генома	Размер (т.п.н.)	Форма
Бактерии			
<i>Escherichia coli</i> K12 (MG1655)	Хромосома	4640	Кольцевая
<i>Bradhyrhizobium japonicum</i>	Хромосома	9207	Кольцевая
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Хромосома	580	Кольцевая
<i>Vibrio cholerae</i>	Хромосома	2941	Кольцевая
	Хромосома	1072	Кольцевая
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Хромосома	2842	Кольцевая
	Хромосома	2057	Линейная
	Плазида	453	Кольцевая
	Плазида	214	Кольцевая
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Хромосома	911	Линейная
	11 плазмид	9-54	Кольцевые и линейные
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Хромосома	8667	Линейная
	Плазида	356	Линейная
	Плазида	31	Кольцевая
Архен			
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Хромосома	5751	Кольцевая
<i>Haloarcula marismortui</i>	Хромосома	3132	Кольцевая
	Хромосома	288	Кольцевая
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	Хромосома	491	Кольцевая

- 
- Бірқатар бактерияларда да бір сақиналы «хромосома» болады: *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*. Алайда геномның бұл құрылымы универсальды емес. Кейбір бактериялар, атап айтқанда *V. cholerae*, *L. interrogans*, *Brucella* spp., екі сақиналы хромосомаға ие. Бірқатар басқа бактериялардың (*Borrelia burgdorferi*, *Streptomyces* spp.) сызықты хромосомалары бар.



Классикалық генетикалық нысан *E. coli* (*Escherichia coli*) геномы өте жақсы зерттелген, онда 4200-ден астам гендер анықталған. *E. coli* ДНҚ құрамында 4,6 млн.н.т. Микоплазмада тірі ағзалардағы генетикалық материалдың ең аз мөлшері (вирустарды қоспағанда) анықталған: 600 000 н.т. және 500-ге жуық гендер. Бұл деректер теориялық есептеулерге негіз болды, бұл қарапайым «өмір машинасы» тек 350 генмен жұмыс істей алатынын көрсетті.

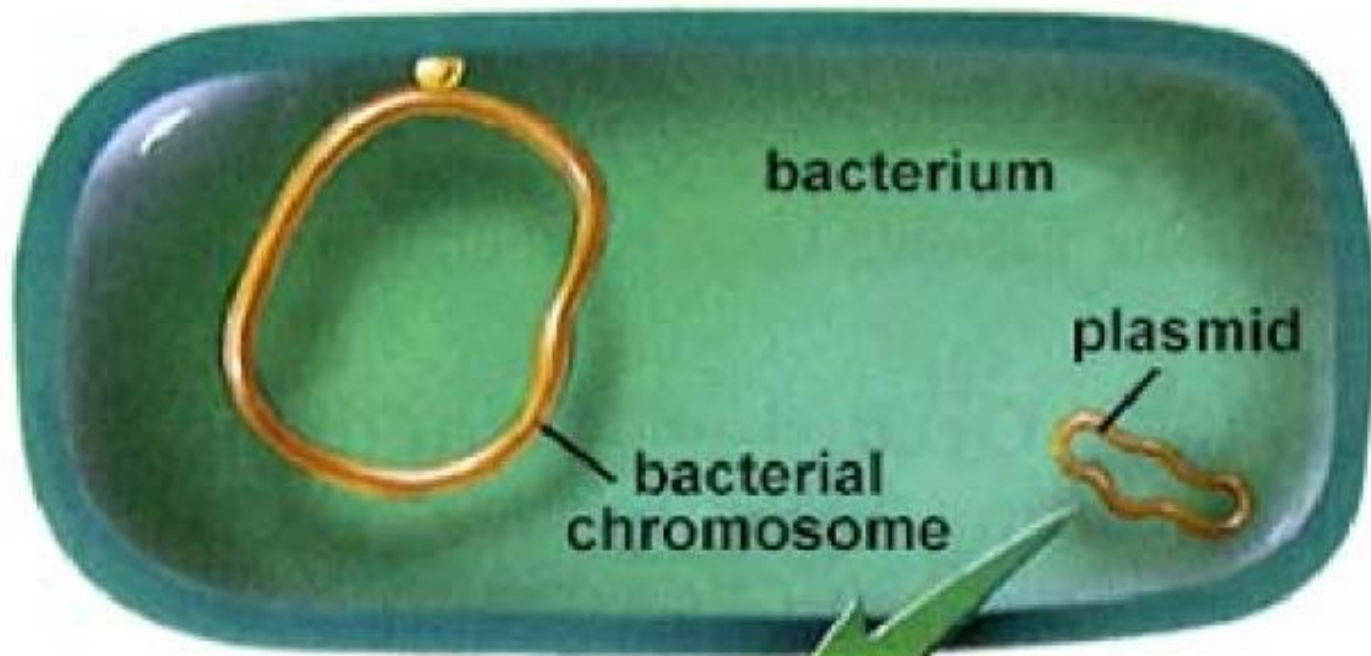
Бактерия плазмидалары.




Плазмидалар - екі тізбекті ДНҚ молекулалары, мөлшері 10^3 - 10^6 н.п. Олар бактерияларға аса қажетті қызметтерді кодтамайды, бактериялар қолайсыз жағдайларға ұшырағанда маңызды рөл атқарады.

Фенотиптік өзгерістердің ішінде бактерия жасушаларына плазмидалар арқылы жеткізілетін көріністердің ішінде келесілерін атап кетуге болады:

- антибиотиктерге тұрақтылық;
- колицин түзу;
- патогенділік факторының өнімі;
- антибиотиктік заттардың синтезделуіне қабілеттілік;
- күрделі органикалық заттарды ыдыратуы;
- рестрикция мен модификациялық ферменттерді түзуі

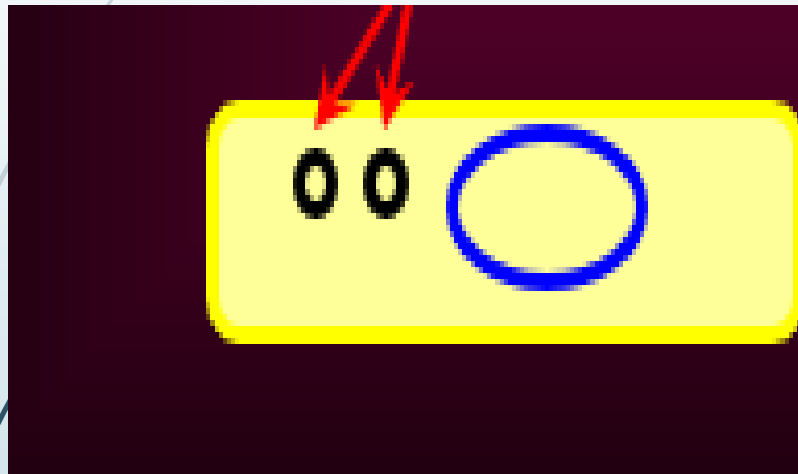


1 μ m

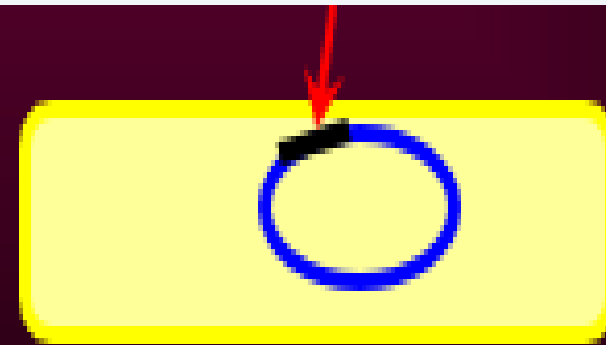
- 
- Плазмида - бұл бактериялардың хромосомалық ДНҚ-дан тыс. Плазмидалардың ерекше белгілері: әдетте сақиналы қос тізбекті пішін (сирек сызықты плазмидалар, тіпті сирек және әдетте уақытша бір тізбекті (аборттық репликация өнімдері),
 - Плазмидтердің өлшемдері өте өзгермелі. Плазмидалардың ең кішісі *E. coli* штамдарында кездеседі 1,5 MD құрайды.
 - • Ал псевдомонадалық жасушаларда салмағы 500 MD болатын плазмидалар бар, бұл массаның 20% құрайдыосы бактерияның хромосомалары

- ▶ Плазмидалар бактериялардың цитоплазмасында кездеседі

БОС КҮЙДЕ – ПЛАЗМИДА



БАЙЛАНЫСҚАН НУКЛЕОДТІ ТҮРДЕ ЭПИСОМА



Автономды күй – плазмидалар хромосомамен физикалық байланыспайды, олар цитоплазмада орналасады;
Интеграцияланған күй – кейбір плазмидалар бактериялды хромосомаға қайтымды түрде біріге алады және бір репликон – интегративті плазмидалар немесе эписомалар қызметін атқара алады.

ПЛАЗМИДАЛАРДЫҢ ТҮРЛЕРІ

F-плазмида (аталық жасушадан аналыққа жыныс қатынасын арттырады, яғни фертильдігін күшейтеді).

R-плазмида (антибиотиктерге төзімділік қасиет береді).

RTF-плазмида (сыртқы орта факторларының әсеріне төзімділік қасиетіне жауапты).

Col-плазмида (микробқа колициногендік қасиет береді).

Ent-плазмида (микроб жасушасында эндотоксин өндірілуіне жауап береді).

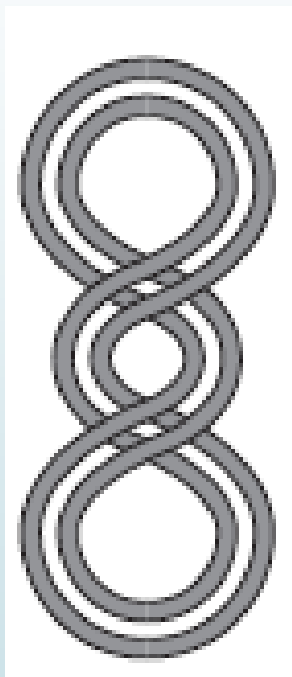
Hly-плазмида (эритроциттерді лизистейтін – гемолиздік қасиет береді).

АЛА-плазмида (антилизозимдік белсенділік факторы).

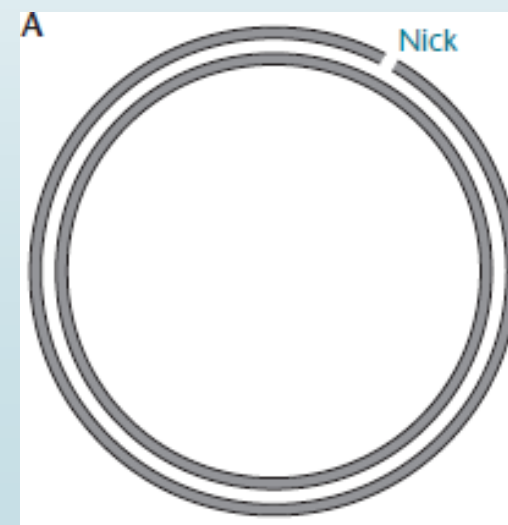
Сақиналы плазмидалардың


құрылысы

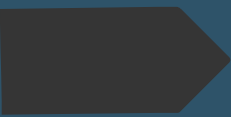
- Кәдімгі плазмида - бұл сақина тәрізді қос тізбекті ДНҚ молекуласы, оның әрбір тізбегі өзіне ковалентті тұйықталған. Көбінесе ccc (covalently closed circle - ковалентті тұйық шеңбер) ДНҚ деп аталады. Хромосомалық ДНҚ сияқты, плазмидалар әдетте аса ширатылған.



Алайда, егер плазмидтік тізбектердің бірі үзілсе, оның құрылымы босаңсиды:



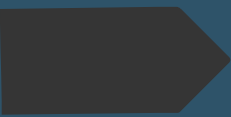
- 
- R-ПЛАЗМИДА (РЕЗИСТЕНТТІЛІК ФАКТОРЫ) - АНТИБИОТИКТЕРДІ ҮДЫРАТЫТЫН ФЕРМЕНТТЕРДІҢ СИНТЕЗІН ДЕТЕРМИНАЦИЯЛАУ, АНТИБИОТИКТЕР ЖАСУША МЕМБРАНАСЫ АРҚЫЛЫ ТАСЫМАЛДАНУЫНЫҢ ТЕЖЕЛУІ.
 - 2 БӨЛІМНЕН ТҰРАДЫ:
 - 1 - БҰЛ РЕЗИСТЕНТТІЛІКТІ БАҚЫЛАЙТЫНТЫН ГЕНДЕР,
 - 2 - ПЛАММИДТІҢ БАСҚА КЛЕТКАҒА ӨТУІН БАҚЫЛАЙТЫН ГЕНДЕР.



F-плазмида (фертильділік факторы) – жыныс пили синтезін, конъюгацияны және хромосома гендерінің және трансмиссивті емес плазмидалардың донордан реципиентке ауысуын бақылайды, ол автономды күйде де, хромосомамен интеграциялық күйде де болуы мүмкін.

F-плазмидасы бар бактериялар генетикалық ақпараттың донорлары болып табылады және hfr-штамдарына жатады.

(High Frequency of Recombination)



COL-ПЛАЗМИДАлар – жақын туысты
БАКТЕРИЯЛАР ТҮРЛЕРІне қатысты белсенді
СИНТБАКТЕРИОЦИНДЕР синтезін БАҚЫЛАЙды.

КОНЮГАЦИЯкезінде ХРОМОСОМАМЕН
тіркеспей автономды жаңдайға ие болады.

ПАТОГЕНДІЛІК ПЛАЗМИДАлары -АДГЕЗИНДЕР,
ИНВАЗИНДЕР, ТОКСИНДЕР синтезін
бақылайды.

БИОДЕГРАЦИЯЛЫҚ ПЛАЗМИДТЕР – кейбір
ОРГАНИКАЛЫҚ ЗАТТАРдың утилизациясын
бақылайды

Бактерия плазмидалары

- Бір жасушада әртүрлі плазмидалар кездеседі. Плазмидалар автономды репликацияға қабілетті, яғни хромосомаға тәуелсіз немесе оның әлсіз бақылауында. Әлсіз бақылаудағы плазмидалардың көшірмелерінің саны бір бактерия жасушасына 200-ге жетуі мүмкін (күшейту), кодталған қасиетін күшейтеді; Кейбір плазмидалар хромосоманың қатаң бақылауында болады. Бұл олардың репликациясы хромосомалардың репликациясымен біріктірілгенін білдіреді, осылайша әрбір бактерия жасушасында плазмидалардың бір немесе кем дегенде бірнеше көшірмелері болады.

Сілтілік лизис арқылы бактерия жасушаларынан плазмида мен фаг ДНҚ-ны бөліп алу

Протеиннің, жасушалық және гендік инженерияның, гендік терапияның және инженерлік энзимологияның қажеттіліктері үшін векторлық ДНҚ бактериялық жасушаларды зақымдайтын плазмидалардан немесе вирустардың репликативті формаларынан алынады.

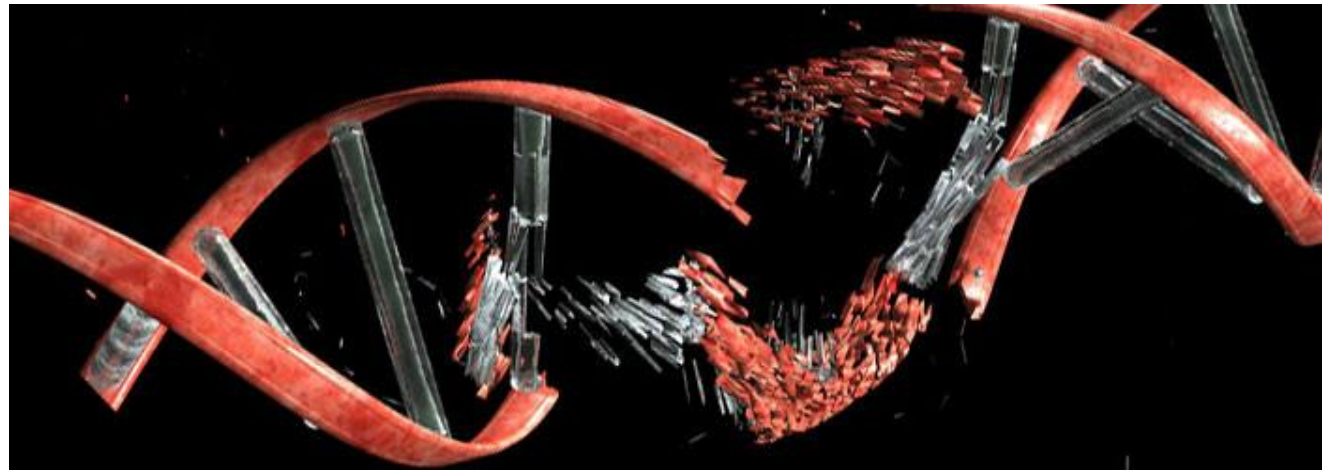
Бұл қос тізбекті ДНҚ молекулалары ковалентті тұйық сақина түрінде болады және иесі жасушада өзін-өзі репликациялауға қабілетті. Тасымалдаушы ретінде бактерияның хромосомадан тыс генетикалық материалын немесе репликативті фагтарды пайдалану үшін оларды жоғары молекулалық хромосомалық ДНҚ-дан бөліп алу керек.




Бирнбойм-Доли әдісімен экстрахромосомалық ДНҚ-ны бөліп алу

- Сілтілі лизис (Бирнбойм-Доли) көмегімен бактерия жасушаларынан фаг пен плазмидті ДНҚ-ны бөліп алу әдісі өткен ғасырдың екінші жартысында жасалған және ең қарапайым және тиімдісі ретінде әлі де әртүрлі модификацияларда қолданылады.
- Қажет болған жағдайда жасуша қабырғасын бұзу үшін лизоцим қолданылады, ал SDS детергент зат рН 12,5-те жасуша мембранасының лизисі үшін қолданылады. Бұл жағдайда хромосомалық ДНҚ-ның фрагментациясы қайтымсыз денатурациямен бірге жүреді, ал денатуратталған плазида молекулалары фрагментацияланбайды және рН 5-ке дейін төмендетілгеннен кейін олар ренатурацияланады.

Оңдеу кезінде хромосомалық ДНҚ-ның денатуратталған фрагменттері жоғары молекулалы сүзбе тәрізді тұнба болып кездейсоқ регидридтенеді. Бұл тұнба ерітіндіде қалған плазмидадан немесе фаг ДНҚ-дан (фагемидтерден) центрифугалау арқылы оңай бөлінеді, содан кейін ол этанолмен немесе изопропанолмен тұнбаға түседі.



Сілтінің әсерінен хромосомалық ДНҚ молекулаларының қайтымсыз денатурациясы жүреді.

- 
- Этанол әдетте биоматериалдың микрокөлемдерімен жұмыс істегенде қолданылады. Үнемдеу үшін үлкен көлемдермен жұмыс істегенде изопропанолды қолдану ұсынылады, өйткені бұл реагент этил спиртіне қарағанда ДНҚ себу үшін әлдеқайда аз көлемде қажет. Спиртте тұндырғаннан кейін плазмидалар немесе фагемидтер белоктардан бөлінуі керек. Бұл фенолды қосылыстар немесе аммоний ацетаты арқылы жасалады. Депротеинизациядан басқа, алынған үлгілерді РНҚ қоспаларынан босату қажет болуы мүмкін. Осы мақсаттар үшін арнайы фермент қолданылады - RNase.

Материалдар мен құрал жабдықтар


Жұмыс термостатикалық басқарылатын айналмалы шайқағышты, зертханалық центрифуганы және плазмид пен фагемидпен трансформацияланған *E. coli* штаммдарын қажет етеді.

Өсіру 2YT сияқты қолайлы құрамы бар қоректік ортада жүргізіледі. Тұнбаны қайта суспензиялау глюкоза, Tris-HCl буфері, ЭДТА және лизоцим бар ерітіндіде жүзеге асырылады, ол қажетінше қолданар алдында бірден қосылады.

Бактериялардың лизисі және ДНҚ-ның сілтілі денатурациясы SDS (натрий додецил сульфаты) араласқан жаңадан дайындалған натрий гидроксиді ерітіндісінің көмегімен жүзеге асырылады. Плазмидалар сонымен қатар су мен мұзды сірке қышқылының қоспасында ерітілген калий ацетатын пайдалана отырып дайындалады.

Сонымен қатар, векторлық ДНҚ-ны бөліп алу процесінде фенол мен хлороформ, хлороформ және изоамил спиртінің қоспалары, ампициллиннің сулы ерітіндісі қолданылады. Материалдың көп мөлшерімен жұмыс істегенде фенолды қоспалардың орнына әдетте аз уытты аммоний ацетаты қолданылады, бұл да центрифугаланған үлгінің көлемін айтарлықтай азайтуға мүмкіндік береді.





<https://study.com/learn/lesson/the-bacterial-genome-structure-size-materials.html>

<https://openoregon.pressbooks.pub/mhccbiology112/chapter/how-dna-is-arranged-in-a-cell/>

<https://www.youtube.com/watch?v=O4p1tp6ARjY>

<https://www.youtube.com/watch?v=SdqJFA6mOkI&t=287s>